

氏名	たなか ひろあき 田中宏明
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第478号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	心筋型 ATP 感受性 K^+ チャンネルはユビキチン/プロテアソーム系により機能的チャンネル 蛋白量が規定される
学位論文審査委員	(主査) 重政 千秋 (副査) 山田 一夫 河合 康明

学位論文の内容の要旨

心筋細胞の ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP}) は内向き整流性 K チャンネルファミリーに属する BIR (Kir6.2) とスルフォニル尿素受容体 (SUR2A) の 2 種類のサブユニットからなる複合体であり、 K_{ATP} は心筋細胞のほかに膵 β 細胞、平滑筋細胞、骨格筋、神経細胞などに存在していることが知られている。最近の研究では、 K^+ チャンネルにおいてチャンネル蛋白を安定化させると、蛋白量が増加する結果、細胞膜でのイオンチャンネル活性が上昇することが報告され、新しいイオンチャンネル活性化機構として注目されている。蛋白の量は転写及び翻訳による合成とリソゾームおよびプロテアソームによる分解により規定されている。しかし、イオンチャンネルを含めた膜蛋白がユビキチン化された後どのような系で分解され、プロテアソーム系が如何に関与しているかは不明である。そこで今回、Kir6.2 チャンネルの分解経路とユビキチン/プロテアソーム系の阻害による Kir6.2 チャンネル蛋白安定化のチャンネル活性に与える効果を検討した。

方法

ラット-Kir6.2 に Flag の epitope-tag を付けた cDNA を真核細胞発現ベクターに組み込み、COS7 細胞に遺伝子導入し発現させ(Flag-Kir6.2)、パルス-チェイス法によるタンパク質分解速度の測定、免疫沈降法によるユビキチン化 Flag-Kir6.2 の検出、ウエスタンブロット法による Flag-Kir6.2 蛋白の検出、ホールセルパッチクランプ法による K_{ATP} チャンネル機能の測定、および免疫蛍光抗体染色による Flag-Kir6.2 の細胞質間輸送をそれぞれプロテアソーム阻害薬である MG132、および Ib 群抗不整脈薬であるアプリンジンの投与前後で比較検討した。なお、ホールセルパッチクランプ法による K_{ATP} チャンネル機能の測定はラット neonatal 心筋細胞による検討も合わせて行った。また、各種抗不整脈薬における 20S プロテアソーム阻害作用についての検討も行った。

結果

パルス-チェイス法による Flag-Kir6.2 の半減期は 1.89 時間であり、プロテアソーム阻害剤である MG132 の前処置下では半減期が 1.68 倍延長した。一方、リソゾーム/エンドソーム阻害薬であるクロロキンの前処置ではその半減期に差を認めなかった。

免疫沈降法によりユビキチン化した Flag-Kir6.2 は特有のスメアを認め、さらに MG132 を前処置することによりスメアの増強が認められた。

ウエスタンブロット法では 40kDa の Flag-Kir6.2 チャネルバンドが認められ、MG132 前処置下でバンドの増強が認められた。

免疫染色法による検討では Kir6.2 チャネルはエンドソームには無く、小胞体とゴルジ体に存在することが明らかとなり、プロテアソーム阻害薬である MG132 の前処置により Kir6.2 チャネルの局在はゴルジ体と小胞体のいずれにおいても増加した。

パッチクランプ法による K_{ATP} 電流は cos7 細胞、neonatal 心筋細胞のいずれにおいても MG132 前処置により増加していた。

20S プロテアソーム阻害作用についての検討では、MG132 はプロテアソームを完全に抑制し、その IC_{50} は 4.1 nM であった。アプリンジンにおいてもプロテアソーム活性はほぼ抑制され、アプリンジンの最大効果は 10 μ M 以上の濃度で得られ、MG132 の最大効果の 50 %程度であった。アプリンジンの IC_{50} は 4.0 μ M であった。

アプリンジンを用いたパルス-チェイス法、免疫沈降法、ウエスタンブロット法、ホールセルパッチクランプ法、免疫蛍光抗体染色の実験いずれにおいても MG132 前処置下での実験とほぼ同様な結果が得られた。

考 察

本研究からはプロテアソームを阻害すると Kir6.2 チャネル蛋白の分解が抑制され、蛋白が安定化し、結果的に正常な機能をもった Kir6.2 チャネルが細胞膜で増加することで、チャネル蛋白安定化を介しての K_{ATP} 活性増加作用は心筋保護的に働くと考えられる。即ち、心筋細胞の K_{ATP} は活性化されることにより、活動電位を短縮し心筋の収縮力を弱め心筋保護に役立つと考えられている。先行する一過性の虚血があると、次に起こった心筋虚血による障害が軽減されるという現象は **ischemic preconditioning** と呼ばれているが、この **preconditioning** 現象には細胞膜での K_{ATP} の関与が重要であることがわかっている。最近 Kir6.2 の **knockout mouse** では **preconditioning** 現象が消失するため **wild type** に比較して心筋障害が増大することが報告されていることから、Kir6.2 チャネル蛋白の増加による細胞膜での K_{ATP} 活性増加は心筋保護的に働くことが明らかである。本研究で見出されたユビキチン/プロテアソーム系の抑制による Kir6.2 チャネル蛋白安定化と K_{ATP} 活性増加作用は **preconditioning** を介して心筋保護に寄与することが示唆された。

今回アプリンジンが臨床濃度でプロテアソームを阻害することにより Kir6.2 チャネル蛋白を安定化させ機能的 K_{ATP} を増加させることが判明した。この新規に明らかとなったアプリンジンの K_{ATP} 活性増加作用は、虚血再灌流時に抗不整脈薬であるアプリンジンが心筋保護的に働くという報告を裏付け、アプリンジンの Kir6.2 蛋白安定化作用が **preconditioning** という観点から臨床的意義があると考えられた。

結 論

Kir6.2 チャネルは速やかにユビキチン化され、プロテアソームにより分解される **short-lived protein** であり、その分解にはリソソーム/エンドソーム系の関与は少なかった。プロテアソームを阻害すると Kir6.2 チャネルの半減期が延長し、結果としてチャネル蛋白が増加した。抗不整脈薬であるアプリンジンにもプロテアソーム阻害作用があることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

心筋の K_{ATP} は虚血再灌流時の **ischemic preconditioning** に際して心筋保護に働くことが知られて

いる。本研究は Kir6.2 チャンネルの分解経路と細胞内輸送経路について、さらに Kir6.2 及び SUR2A の共発現系及び primary culture 心筋を用いて、ユビキチン/プロテアソーム系の阻害による Kir6.2 チャンネル蛋白安定化が、K_{ATP} 活性に与える効果を検討したものである。その結果、Kir6.2 チャンネルはユビキチン化された後プロテアソーム系により急速に分解され、この過程においてはリソソーム/エンドソーム系の関与はほとんどないことを明らかにした。さらに、ユビキチン/プロテアソーム系を阻害することにより Kir6.2 チャンネル蛋白は小胞体からゴルジ体を経て細胞膜へと輸送される量が増加し、機能的 K_{ATP} 活性増加をもたらすことを示した。また、Ib 群抗不整脈薬であるアプリンジンが 20S プロテアソーム阻害作用を通して Kir6.2 チャンネルを安定化させ、K_{ATP} 活性を増強させることも明らかにした。本論文の内容は、今後抗不整脈薬であるアプリンジンが新たに心筋保護の観点から臨床応用可能であることを強く示唆し、循環器病学の上で明らかに学術の水準を高めたものと認められる。